

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22985

研究課題名(和文) 体外培養した骨髄由来免疫抑制細胞による高リスク角膜移植後の新規免疫寛容療法の開発

研究課題名(英文) Ex vivo-induced bone marrow-derived myeloid suppressor cells prevent corneal allograft rejection in mice

研究代表者

藤本 啓一 (Fujimoto, Keiichi)

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：10876684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、体外培養した骨髄由来免疫抑制細胞(BM-MDSC)の免疫抑制効果を高リスク角膜移植マウスモデルで検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容療法開発の基盤研究を実施した。BM-MDSCの混合リンパ球反応への付加により炎症性サイトカインの減少、抑制性サイトカインの増加、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導を認めた。結膜下注射によるBM-MDSCの角膜移植片へ移行ならびに生存率の延長、血管新生ならびにリンパ管新生の抑制を認めた。BM-MDSCはiNOS経路を介して、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導、血管・リンパ管新生の抑制によりマウス角膜移植の拒絶反応を抑制を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、体外培養した骨髄由来免疫抑制細胞(BM-MDSC)の免疫抑制効果を高リスク角膜移植マウスモデルで検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容療法開発の基盤研究を実施した。BM-MDSCの混合リンパ球反応への付加により炎症性サイトカインの減少、抑制性サイトカインの増加、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導を認めた。結膜下注射によるBM-MDSCの角膜移植片へ移行ならびに生存率の延長、血管新生ならびにリンパ管新生の抑制を認めた。BM-MDSCはiNOS経路を介して、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導、血管・リンパ管新生の抑制によりマウス角膜移植の拒絶反応を抑制を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study examined the immunosuppressive effects of in vitro cultured bone marrow-derived immunosuppressive cells (BM-MDSCs) in a murine high-risk corneal transplantation model. Addition of BM-MDSCs to the mixed lymphocyte response decreased inflammatory cytokines, increased inhibitory cytokines, suppressed T cell proliferation, and induced regulatory T cells. Subconjunctival injection of BM-MDSCs showed corneal graft migration of BM-MDSC, prolonged graft survival, suppressed angiogenesis and lymphangiogenesis. BM-MDSCs have been shown to inhibit rejection of murine corneal transplantation by suppressing T cell proliferation, inducing regulatory T cells, and inhibiting vascular and lymphangiogenesis via the iNOS pathway.

研究分野：角膜移植免疫

キーワード：角膜移植 骨髄由来免疫抑制細胞 制御性T細胞 免疫寛容 血管新生 リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

ステロイド・シクロスポリン・タクロリムスなどの免疫抑制剤の登場により、角膜移植後の急性拒絶反応は減少したが、未だに感染症・自己免疫疾患の合併・再移植などで血管新生が生じた高リスク角膜移植ではその 40-90%に拒絶反応を伴う(The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group, Arch Ophthalmol, 1992)。しかし免疫抑制剤は慢性拒絶反応には無効であることや、その副作用(緑内障、糖尿病など)など未だ問題が多い。また、本邦においてはドナー角膜が充足しているとはいえ、移植臓器における長期的な免疫寛容(免疫抑制剤を中止しても移植臓器が十分に機能する状態)の成立が臨床的に重要である。

角膜移植における拒絶反応の段階は、角膜移植によって新生した血管由来のレシピエント免疫系細胞が移植したドナー角膜を異物として認識、頸部リンパ節で抗原提示、ナイーブ T 細胞がエフェクター T 細胞へ分化、そして標的移植角膜を破壊である(Amouzegar A, Journal of Immunology, 2016)。制御性 T 細胞は抗原特異的にこの免疫応答に抑制的に働く(Inomata T, Sci Rep, 2016)が、転写因子 Foxp3 の誘導と制御性 T 細胞型エピゲノム形成がともに必要であるため、ヒト生体内で制御性 T 細胞の増幅は困難である(Ohkura N, Immunity 2012)。その問題解決には、制御性 T 細胞の有効な増幅方法の開発や炎症環境下でも制御性 T 細胞を安定的に誘導する免疫抑制経路を解明し、移植角膜に効率的に誘導することが重要である。

骨髄由来免疫抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)は顆粒球系細胞の前駆細胞であり、癌や炎症性疾患等の病的環境下で体内誘導される細胞集団である(体内誘導 MDSC)。この体内誘導 MDSC は、IL-10、TGF- β など抑制性サイトカインの産生に係る制御性 T 細胞の誘導や、iNOS 活性化を介して NO を産生し、アポトーシス誘導によるエフェクター T 細胞の増殖抑制能を有する。注目すべきは、最近の研究から MDSC は骨髄細胞に癌や炎症性疾患の微小環境に含まれる因子を加えることで体外培養できると判明したこと(体外培養 MDSC)、そして、体内誘導 MDSC と同様に制御性 T 細胞の誘導能やエフェクター T 細胞の増殖抑制能を有するとの報告である(Pistoia V, Front Oncol, 2013)。このように、局所炎症環境下の高リスク角膜移植に対する体外培養 MDSC の応用は、拒絶反応を抑える有効な技術として期待できるが、どれほど効率的にこの細胞が免疫抑制を誘導するのか不明瞭なことが学術的な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生血管・炎症を誘導した高リスク角膜移植マウスモデルを用い、体外培養 MDSC 移入による免疫抑制効果を検証して、体外培養 MDSC を用いたヒト角膜移植における新規免疫寛容療法開発の基盤となる科学的根拠を得ることである。

本研究から、体外培養 MDSC 投与による新規免疫抑制法が確立できれば、副作用なく角膜移植片に免疫寛容を成立させることができ、既存の治療法を代替できる可能性がある。また、移植後のステロイド使用に伴う糖尿病悪化や、高眼圧による緑内障発症等の副作用を予防できる。補後の使用によりステロイド使用量を減らし副作用を最小限にすることができるといった既存治療のデメリットを補う可能性を持った新規の免疫抑制細胞療法となる。

3. 研究の方法

(1) 体外培養 MDSC の作成

マウス脛骨から骨髄細胞を採取し、シャーレ内で GM-CSF、IL-6 を付加した培養液とともに 4~5 日間 37°C で培養する。骨髄細胞はドナーマウス(C57BL6)もしくはレシピエントマウス(BALB/c)から採取する。(プロトコルは作成済みである)

(2) 体外培養 MDSC の免疫抑制能の評価 (インビトロ)

レシピエントマウスのリンパ球にドナーマウスリンパ球でアロ抗原刺激を加え(混合リンパ球反応)、そこに 2 種の MDSC をそれぞれ加え共培養し、3~4 日後にトリチウム試験にて制御性 T 細胞ならびにエフェクター T 細胞の分布をフローサイトメトリー(FCM)で評価する。さらにアロ抗原刺激の際に発生する炎症性サイトカイン(IFN γ 、IL-17)や制御性 T 細胞の産生維持に関わる抑制性サイトカイン(IL-2、IL-10、TGF- β 等)の発現量を ELISA 法にて計測する。

(3) マウス高リスク角膜移植モデルの作成 (インビボ)

角膜実質に 14 日間ナイロン糸を留置し、新生血管を誘導した高リスクレシピエント角膜を作成する。ドナーマウスからレシピエントマウスに同種異型角膜移植を行う。

(4) 投与した MDSC の角膜移植片への移行性の評価 (インビボ)

GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞から培養した GFP 陽性体外培養 MDSC を移植後に結膜下投与する。投与した体外培養 MDSC の局在を評価するために、移植投与 1~2 日後に角膜移植片及び頸部リンパ節を採取し、GFP 陽性 MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺細胞)の局在を FCM で確認する。さらに、H&E 及び免疫染色にて浸潤した MDSC の同定を行う。

(5) 体外培養 MDSC 移入における高リスク角膜移植における血管・リンパ管新生抑制能の評価

(1)で作成した2種の体外培養 MDSC を高リスク角膜移植に結膜下投与する。投与後8週間の角膜移植片の混濁スコア、血管新生スコアを細隙灯顕微鏡にて評価する。また、角膜移植片を経時的に採取し、血管内皮細胞(CD31)、リンパ管(Lyve-1)を免疫染色し、角膜移植片の血管・リンパ管新生を Image J を用いて定量化する(定量化ソフトは開発済み)。

(6) 高リスク角膜移植モデルにおける体外培養 MDSC 投与による免疫抑制能の評価

体外培養 MDSC を投与後14日目に角膜移植片、頸部リンパ節を採取し、FCMにてMDSC、制御性T細胞、エフェクターT細胞等の免疫細胞の分布を評価する。また、免疫抑制分子、抑制性・炎症性サイトカイン等の発現量を real-time PCR 法にて mRNA レベルで測定する

4. 研究成果

本研究は、体外培養 MDSC の免疫抑制効果を高リスク角膜移植マウスモデルで検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容療法開発の基盤研究を実施した。

C57/BL6J マウスの骨髄細胞をインターロイキン(IL)-6、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)と共培養し、体外培養 MDSC (Gr1 陽性 CD11b 陽性細胞)を誘導した。混合リンパ球反応(MLR)に体外培養 MDSC を付加し、T細胞増殖能を評価した。また、フローサイトメトリーで制御性T細胞の割合を測定した。MLR後のサイトカインの発現量(ELISA法)、誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現(リアルタイムPCR法)ならびに一酸化窒素(NO)の産生を測定した。血管新生を誘導した高リスクマウス角膜移植モデルを作成し、結膜下注射による体外培養 MDSC の移入ならびに角膜移植片の生存率、血管・リンパ管新生を評価した。

IL-6 と GM-CSF の共培養により iNOS の発現が増加した BM-MDSC が誘導された。BM-MDSC の MLR への付加により炎症性サイトカインの減少、抑制性サイトカインの増加、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導を認めた。また、結膜下注射による体外培養 MDSC の角膜移植片へ移行ならびに生存率の延長(図1a)、角膜混濁の低下(図1b)、血管新生(図1c)ならびにリンパ管新生(図1d)の抑制を認めた。体外培養 MDSC は iNOS 経路を介して、T細胞増殖の抑制、制御性T細胞の誘導、血管・リンパ管新生の抑制によりマウス角膜移植片の拒絶反応を抑制した。

本研究では、体外培養した体外培養 MDSC の免疫抑制効果を高リスクマウス角膜移植モデルで検証し、ヒト角膜移植における新規免疫寛容療法 開発の基盤を構築した。

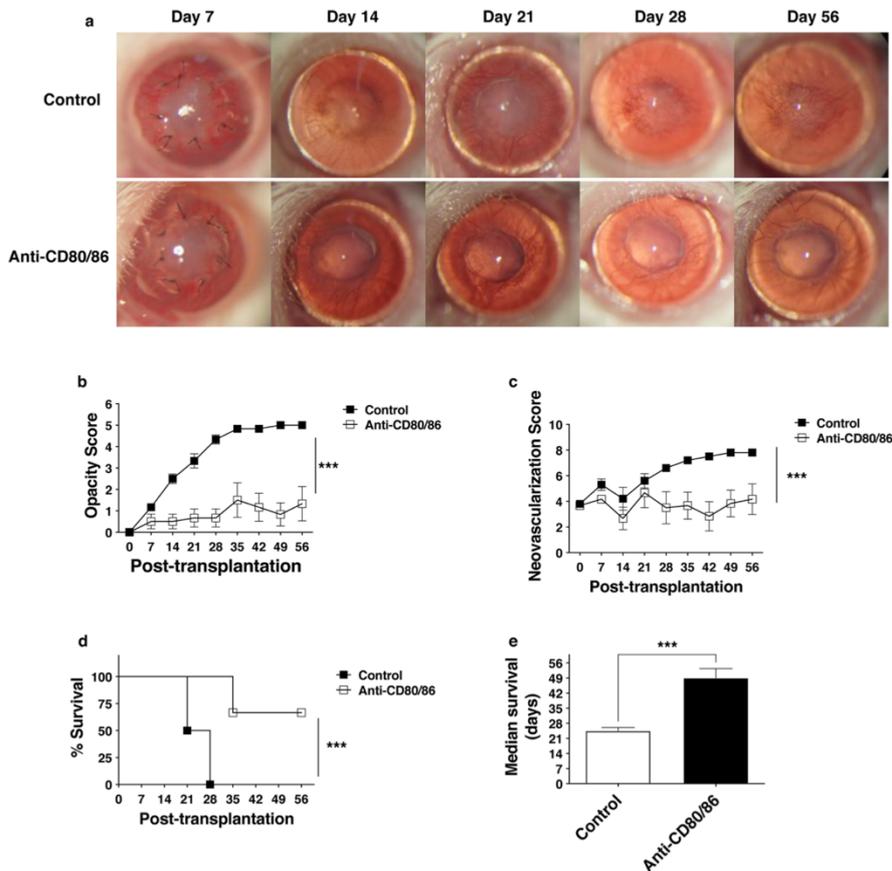


図1. 体外培養 MDSC の結膜下注射による角膜移植片の免疫抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zhu J, Inomata T, Di Zazzo A, Kitazawa K, Okumura Y, Coassin M, Surico PL, Fujio K, Yanagawa A, Miura M, Akasaki Y, Fujimoto K, Nagino K, Midorikawa-Inomata A, Hirosawa K, Kuwahara M, Huang T, Shokirova H, Eguchi A, Murakami A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Immune Cell Diversity and Heterogeneity in Corneal Graft Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4667 ~ 4667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10204667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu J, Inomata T, Fujimoto K, Uchida K, Fujio K, Nagino K, Miura M, Negishi N, Okumura Y, Akasaki Y, Hirosawa K, Kuwahara M, Eguchi A, Shokirova H, Yanagawa A, Midorikawa-Inomata A, Murakami A.	4. 巻 62
2. 論文標題 Ex Vivo-Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 3 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.7.3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujio Kenta, Sung Jaemyoung, Nakatani Satoru, Yamamoto Kazuko, Iwagami Masao, Fujimoto Keiichi, Shokirova Hurrarmon, Okumura Yuichi, Akasaki Yasutsugu, Nagino Ken, Midorikawa-Inomata Akie, Hirosawa Kunihiko, Miura Maria, Huang Tianxiang, Morooka Yuki, Kuwahara Mizu, Murakami Akira, Inomata Takenori	4. 巻 11
2. 論文標題 Characteristics and Clinical Ocular Manifestations in Patients with Acute Corneal Graft Rejection after Receiving the COVID-19 Vaccine: A Systematic Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4500 ~ 4500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11154500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu J, Inomata T, Nakamura M, Fujimoto K, Akasaki Y, Fujio K, Yanagawa A, Uchida K, Sung J, Negishi N, Nagino K, Okumura Y, Miura M, Shokirova H, Kuwahara M, Hirose K, Midorikawa-Inomata A, Eguchi A, Huang T, Yagita H, Habu S, Okumura K, Murakami A	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-CD80/86 antibodies inhibit inflammatory reaction and improve graft survival in a high-risk murine corneal transplantation rejection model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08949-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu J, Inomata T, Di Zazzo A, Kitazawa K, Okumura Y, Coassin M, Surico Pier L, Fujio K, Yanagawa A, Miura M, Akasaki Y, Fujimoto K, Nagino K, Midorikawa-Inomata A, Hirose K, Kuwahara M, Huang T, Shokirova H, Eguchi A, Murakami A	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of Immune Cell Diversity and Heterogeneity in Corneal Graft Survival: A Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4667 ~ 4667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10204667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------